

лин реализует своё влияние, задействованы в максимальной степени. Поэтому перфузия сосудистых полосок эндотелином не обуславливает его стимулирующее влияние на развитие активных миогенных реакций СГМ. О вовлечении эндотелина в реализацию зависимости длина-сила СГМ свидетельствует и значительно большее угнетающее действие фосфорамидона.

Литература

1. Сагач В.Ф. Эндотелии и сердечно-сосудистая система // Физиол. журн. – 1998. – 44, № 1-2. – С. 103-111.
2. Хаютин В.М. Механорецепция эндотелия артериальных сосудов и механизмы защиты от развития гипертонической болезни // Кардиология. – 1996. – 36, № 7. – С. 27-35.
3. Kramer B.K., Ackermann M., Kohler S.M., Riegger G.A. Role of endothelin in hypertension // Clin. Investig. – 1994. – 72, № 2. – P. 88-93.
4. Lee R.M., Owens G.K., Scott-Burden T. et al. Pathophysiology of smooth muscle in hypertension // Can. J. Physiol. and Pharmacol. – 1995. – 73, № 5. – P. 574-584.
5. Masaki T. Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 1995. – 35. – P. 235-255.
6. Tkachenko M.N., Sagach V.F. Length-tension dependence in vascular smooth muscle: possible participation of endothelin // Experientia. – 1995. – 51, № 9-10. – P. 936-940.
7. Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S. et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells // Nature. – 1988. – 332, № 6163. – P. 411-415.

МЕХАНИЗМЫ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ ДЕПОНИРОВАНИЯ ОКСИДА АЗОТА В СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЕ: ГИПОТЕЗА

¹Шебеко В.И., ¹Солодков А.П., ²Манухина Е.Б., ³Ванин А.Ф.

¹*Государственный медицинский университет, г. Витебск,*

²*НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, г. Москва,*

³*Институт химической физики РАН, г. Москва*

Депонированные формы оксида азота (NO), вероятно, вносят существенный вклад в механизмы реализации многочисленных функций NO в сердечно-сосудистой системе [13]. Понять биологическую роль депонированных форм NO в сердечно-сосудистой системе можно лишь

только обнаружив ключевые механизмы, способные динамично регулировать как депонирование, так и освобождение NO из депо в зависимости от состояния клеток этой системы. Механизмы такой регуляции пока еще неизвестны, хотя уже установлено, что интенсивность продукции оксида азота NO-синтазой является одним из факторов, влияющим на выраженность депонирования NO в кровеносных сосудах [2].

Мы склонны считать, что изменение образования активных форм кислорода в клетках и, связанное с этим, динамичное изменение редокс-состояния клеток или клеточных компартментов играет важнейшую регулирующую роль в механизмах депонирования NO. Причем, окислительный стресс и редокс-состояние клеток, вероятно, влияют не только на характер преимущественного образования какой-то определенной формы депо NO (динитрозильные комплексы железа с тиоловыми группами, S-нитрозотиолы, аддукты NO с глюкозой и функциональными группами спиртов), но и на скорость освобождения NO из депо. Такое мнение основывается прежде всего на фактах, демонстрирующих достаточно четкую детерминированность типа молекулярных мишеней для NO, поскольку молекула NO имеет неспаренный электрон на внешней орбитали, а также - на неоспоримых доказательствах ключевой роли редокс-состояния клеток в механизмах регуляции их функций, в том числе и в механизмах динамической регуляции фенотипа эндотелиоцитов [3].

Редокс-состояние клетки (компартмента) зависит от значений редокс-потенциала существующих в клетке редокс-пар и от восстанавливающей способности таких редокс-пар, т.е. от концентрации восстановленных форм веществ, входящих в редокс-пары [19]. Важнейшая роль в механизмах регуляции редокс-состояния клеток принадлежит редокс-системе глутатиона, НАДФ, тиоредоксина, а также глутаредоксинам и пероксиредоксинам. Определение степени окисления/восстановления различных редокс-активных веществ, присутствующих в клетке (компартменте) позволяет оценить редокс-состояние клетки (компартмента) в данный момент времени.

Почему же предположение о важности роли редокс-состояния клетки/компартмента в регуляции депонирования NO и в определении формы такого депонирования представляется нам вполне обоснованным? Прежде чем изложить некоторые аргументы в поддержку высказанного предположения, назовем еще раз две важнейшие формы депо NO - динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами и S-нитрозотиолы [1]. Разумеется, возможность и скорость образования таких соединений в клетках будет определяться содержанием в них железа и доступностью тиоловых групп для S-нитрозирования.

Хорошо известно, что окислительный стресс способен оказывать влияние на величину лабильного пула низкомолекулярного редокс-активного железа в клетках, в частности, через стимуляцию его освобо-

ждения из ферритина, гемсодержащих белков и из так называемых «железосероцентров» белков [4, 11]. Необходимо, однако, отметить, что скорость освобождения железа из ферритина под действием супероксида является достаточно низкой. Редокс-состояние клетки регулирует содержание низкомолекулярного редокс-активного железа еще и через изменение скорости синтеза ферритина и рецептора для трансферрина. Так, окислительный стресс подавляет активность IRP (Iron Responsive Proteins), причем это действие не зависит от выраженности мобилизации железа из ферритина [5]. Подавление активности IRP, вероятно, способствует уменьшению содержания редокс-активного железа в клетке вследствие повышения синтеза ферритина и снижения синтеза рецептора для трансферрина. Выраженность подавления активности IRP под действием активных форм кислорода может регулироваться редокс-состоянием клетки. Действительно, N-ацетилцистеин препятствует подавлению активности IRP в процессе реперфузии ткани после ишемии. Возможно, это связано с увеличением внутриклеточной концентрации восстановленного глутатиона [5].

Изменение редокс-состояния клетки/компартамента влияет также на содержание в клетке ионов цинка и, возможно, ионов меди. Например, нарушение баланса между GSH и GSSG в клетке с увеличением содержания GSSG стимулирует освобождение цинка из металлотионеина [10]. Освобождающийся из металлотионеина цинк может снижать поступление железа в клетку. Так как редокс-состояние клетки способно влиять на содержание в ней ионов цинка и, возможно, меди, то логично поставить вопрос, могут ли ионы этих металлов, наряду с ионами железа, принимать участие в образовании нитрозильных комплексов в определенных условиях.

Доступность SH-групп цистеиновых остатков протеинов клетки для S-нитрозирования, несомненно, изменяется в зависимости от уровня окислительного стресса, его продолжительности и характеристик редокс-состояния клетки. Окисление SH-групп цистеиновых остатков протеинов в условиях окислительного стресса может быть обратимым, при образовании сульфеновой кислоты (Протеин-SOH) и необратимым, при образовании сульфиновой (Протеин-SO₂H) и сульфоновой кислот (Протеин-SO₃H) [6]. Наряду с этим, изменение состояния редокс-системы глутатиона, сопровождающееся увеличением относительного содержания GSSG, стимулирует образование смешанных дисульфидов с глутатионом (Протеин-SSG), а также, образование дисульфидных групп в белковых молекулах вследствие протекания реакций обмена тиол-дисульфид. Динамика же восстановления тиоловых групп протеинов зависит от эффективности функционирования редокс-системы глутатиона, тиоредоксина, глутаредоксина и от функции протеиновой дисульфи-

дизомеразы. Значит, доступность тиоловых групп протеинов для S-нитрозирования существенно зависит от редокс-состояния клетки.

Известно, что взаимодействие оксида азота с кислородом приводит к образованию N_2O_3 . Особенно эффективно такое взаимодействие протекает в гидрофобных условиях, наблюдающихся в клеточных мембранах и внутри белковых молекул [12]. Так как N_2O_3 имеет выраженную способность к осуществлению S-нитрозирования протеинов [9], то депонирование NO в виде S- нитрозотиолов в клеточных мембранах может быть достаточно выраженным. Разумеется, окислительный стресс и редокс-состояние клетки будут влиять на скорость S-нитрозирования мембранных протеинов, по крайней мере, через модификацию редокс-состояния SH-групп этих протеинов. Протеиновая дисульфидизомераза клеточной мембраны также может оказывать влияние на выраженность S-нитрозирования протеинов мембраны. В зависимости от того, находятся ли цистеиновые остатки активного центра этого фермента в восстановленном или окисленном состоянии, он катализирует либо восстановление дисульфидных связей в протеинах, либо образование таковых [8]. В свою очередь, окисление/восстановление цистеиновых остатков активного центра протеиновой дисульфидизомеразы зависит от редокс-системы глутатиона, а значит и от редокс-состояния клетки. Кстати, в условиях окислительного стресса тиоредоксин, также как и окисленная форма протеиновой дисульфидизомеразы, способен катализировать образование дисульфидных связей в протеинах. Следовательно, эффективность и скорость депонирования NO в мембране клеток в форме S-нитрозотиолов протеинов, несомненно, зависит от редокс-состояния клеток.

При обсуждении механизмов регуляции депонирования NO в клетках сосудистой стенки необходимо обратить внимание на важность роли пероксинитрита в этих механизмах. Считается, что максимальное количество пероксинитрита образуется вблизи от источников продукции супероксида. Пероксинитрит взаимодействует в клетке преимущественно с тиолами, вследствие высокой скорости такой реакции и большой внутриклеточной концентрации тиолов, особенно глутатиона [18]. Первичными продуктами взаимодействия пероксинитрита с восстановленным глутатионом являются тиильные радикалы и производные сульфеновой кислоты, которые затем реагируют с восстановленным глутатионом, с образованием окисленного глутатиона [15]. Значит, глутатион играет важную роль в защите клеток от повреждающего действия пероксинитрита. Однако в рамках обсуждаемой взаимосвязи между депонированием NO и редокс-состоянием клетки необходимо обратить внимание на то обстоятельство, что в клеточных компартментах с высокой концентрацией пероксинитрита может нарушаться состояние редокс-системы глутатиона вследствие изменения соотношения между

окисленным и восстановленным глутатионом, а также из-за снижения абсолютной концентрации восстановленного глутатиона. Это, естественно, будет влиять на доступность тиоловых групп для S-нитрозирования и на содержание низкомолекулярного редокс-активного железа в клетке. Весьма вероятно, что в непосредственной близости от НАД(Ф)Н-оксидазы, присутствующей в эндотелиоцитах и гладкомышечных клетках сосудов, образуются достаточно высокие концентрации пероксинитрита, влияющие на депонирование NO в клеточной мембране и цитозоле. Такое предположение кажется интересным в контексте современных представлений о том, что НАД(Ф)Н-оксидаза является важнейшим источником образования супероксида в стенке кровеносных сосудов при некоторых формах патологии, например, при атеросклерозе и артериальной гипертензии.

Роль пероксинитрита в механизмах регуляции депонирования NO вряд ли ограничивается только его влиянием на редокс-систему глутатиона. Следует учитывать, что пероксинитрит может образовывать целый ряд доноров NO: S-нитрозотиолов при взаимодействии с тиолами; S-нитроглутатиона (GSNO_2) при взаимодействии с глутатионом; органических нитратов и нитритов при взаимодействии с функциональными группами спиртов; глицеролтринитрата и глицеролмононитрата при взаимодействии с глицеролом, а также NO-производного мочевой кислоты [17]. Кроме того, пероксинитрит способен ингибировать глутатионпероксидазу и снижать содержание в клетках аскорбината.

Освобождение NO из депо, вероятно, также регулируется редокс-состоянием клетки/компартамента. Уже тот факт, что дитиокарбаматы и N-ацетилцистеин, вещества, использующиеся для выявления депо NO, проявляют свойства антиоксидантов и тиолмодифицирующих веществ, побуждают нас прийти к такому предположению. Это предположение основано также на следующих уже установленных фактах.

Во-первых, хорошо известно, что распад S-нитрозотиолов с образованием NO происходит с участием ионов железа и меди [1, 9]. Уровень же низкомолекулярного редокс-активного железа и меди в клетке регулируется ее редокс-состоянием. Кстати, дитиокарбаматы могут увеличивать внутриклеточную концентрацию редокс-активной меди.

Во-вторых, распад S-нитрозотиолов, а также других NO-доноров, образующихся при взаимодействии сахаров и спиртов с пероксинитритом, зависит от присутствия восстановленных тиолов [7]. В свою очередь, редокс-состояние клетки определяет содержание восстановленного глутатиона и редокс-состояние тиоловых групп протеинов.

В-третьих, редокс-состояние клетки способно влиять на депонирование NO и через изменение действия аскорбината. Установлено, что аскорбинат способен стимулировать освобождение NO из низко- и высокомолекулярных S-нитрозотиолов [20]. Кроме того, аскорбинат обес-

печивает регенерацию глутатиона, регулирует поступление железа в клетки, по механизму, не зависящему от трансферрина, и регулирует редокс-состояние тиолов мембранных протеинов [14]. Совершенно очевидно, что выраженность действия аскорбината будет зависеть от редокс-состояния клетки. Действительно, восстановленный глутатион предотвращает окисление аскорбината, а тиоредоксинредуктаза и глутаредоксин обеспечивают восстановление радикала аскорбиновой кислоты и дигидроаскорбиновой кислоты.

Наконец, в-четвертых, распад S-нитрозотиолов может происходить с участием системы тиоредоксина [16]. Функция же этой системы, а, значит, и эффективность распада S-нитрозотиолов по такому механизму, будет определяться редокс-состоянием клетки.

Таким образом, окислительный стресс и редокс-состояние клетки, вероятно, играют ключевую роль в механизмах регуляции депонирования NO. Если принять эту гипотезу, то становится понятным, что депонирование NO в сердечно-сосудистой системе является очень динамичным процессом, тесно связанным с состоянием и функцией клеток этой системы. Поэтому депонирование и освобождение NO из депо наблюдаются в клетках сердечно-сосудистой системы «в нужное время и в нужном месте».

Литература

1. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы - две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах. // Биохимия. - 1998. - Т.63. - С.924-938.
2. Пшенникова М.Г., Смирин Б.В., Бондаренко О.Н. и соавт. Депонирование оксида азота у крыс разных генетических линий и его роль в антистрессорном эффекте адаптации к гипоксии. // Российский физиол. журнал им. И.М. Сеченова. - 2000. - Т.86. - С.174-181.
3. Шебеко В.И. Редокс-регуляция динамического характера фенотипа эндотелиоцитов кровеносных сосудов // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования. Труды научн. конф. - Витебск, 2000. - С.45-52.
4. Biemond P., VanEnk H.G., Swaak A.J., Kostner J.F. Iron mobilization from ferritin by superoxide derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. // J. Clin. Invest. - 1984. - V.73. - P.1576-1579.
5. Cairo G., Tacchini L., Recalcati S., et al. Effect of reactive oxygen species on iron regulatory protein activity. // Ann. N.Y. Acad. Sci. - 1998. - V.851. - P.179-186.
6. Claiborne A., Yeh J.I., Mallett C., et al. Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation. // Biochemistry. - 1999. - V.38. - P.15407-15416.

7. Crow J.P., Beckman J.S. Reaction between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: footprints of peroxynitrite in vivo. // *Adv. Pharmacol.* - 1995. - V.34. - P.17-43.
8. Frand A.R., Cuozzo J.W., Kaiser C.A. Pathways for protein disulfide bond formation. // *Trends Cell Biol.* - 2000. - V.10. - P.203-210.
9. Gaston B. Nitric oxide and thiol groups. // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1999. - V.1411. - P.323-333.
10. Jacob C., Maret W., Vallee B.L. Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1998. - V.95. - P.3489-3494.
11. Keyer K., Imlay J.A. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1996. - V.93. - P.13635-13640.
12. Liu X.M., Miller J.S., Joshi S., et al. Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1998. - V.95. - P.2175-2179.
13. Manukhina E.B., Malyshev I.Yu., Smirin B.V., et al. Production and storage of nitric oxide in adaptation to hypoxia. // *Nitric Oxide: Biol. and Chem.* - 1999. - V.3. - P.393-401.
14. May J.M. Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? // *FASEB J.* - 1999. - V.13. - P.995-1006.
15. Murphy M.H., Packer M.A., Scarlett J.L., Martin S.W. Peroxynitrite a biologically significant oxidant. // *Gen. Pharmacol.* - 1998. - V.31. - P.179-186.
16. Nikitovic D., Holmgren A.S. S-Nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide. // *J. Biol. Chem.* - 1996. - V.271. - P.19180-19185.
17. Patel R.P., McAndrew J., Sellak H., et al. Biological aspects of reactive nitrogen species. // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1999. - V.1411. - P.385-400.
18. Radi R., Beckman J.S., Bush K.M., Freeman B.A. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. // *Biol. Chem.* - 1991. - V.266. - P.4244-4250.
19. Schafer F.Q., Buettner G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple // *Free Radical Biol. Med.* - 2001. - V.30. - P.1191-1212.
20. Xu A., Vita J.A., Keaney J.F. Ascorbic acid and glutathione modulate the biological activity of S-nitrosoglutathione. // *Hypertension.* - 2000. - V.36. - P.291-297.